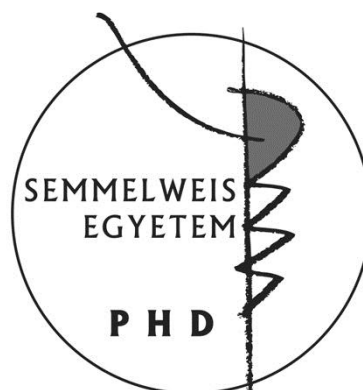


Excitátoros aminosav neurotranszmitterek meghatározása biológiai mintákból kapilláris elektroforézissel

Doktori tézisek

Dr. Wagner Zsolt

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Szökő Éva egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók:

Dr. Kilár Ferenc, egyetemi tanár, DSc

Dr. Gergely András, egyetemi docens, CSc

Szigorlati bizottság elnöke:

Takácsné Dr. Novák Krisztina,
egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Riba Pál, egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Németh Krisztina tudományos munkatárs,
PhD

Budapest

2012

1. Bevezetés

A glutamát és az aszpartát a központi idegrendszer két legjelentősebb serkentő (excitátoros) neurotranszmittere. Azonban míg a glutamát funkcióját széleskörűen tanulmányozzák, az aszpartát élettani szerepéről lényegesen kevesebb információval rendelkezünk. Sem a felszabadulás pontos mechanizmusa, sem az összetett agyi funkciókban betöltött pontos szerepe nem ismert.

Az aminosavak a glicin kivételével királis molekulák, tehát két azonos kémiai és fizikai tulajdonsággal bíró, de egymásba átalakulni nem képes L, illetve D előtaggal jelölt formát különböztethetünk meg, melyek egymás tükörképi párjai. Sokáig úgy tartották, hogy az élő szervezetekben kizárólag az aminosavak L formája található meg, azonban a közleműltban emlősök és madarak központi idegrendszerében számos D-aminosavat, többek között D-aszpartátot is kimutattak. A D-aszpartát vizsgálatát ugyanakkor megnehezíti a szövetmintákban egyidejűleg jelen lévő magas L-enantiomer felesleg. A kísérleti eredmények alapján jelenleg azt feltételezzük, hogy a D-aszpartát neuromodulátorként szerepet játszhat a korai idegrendszeri fejlődésben, valamint felnőttkorban a memória funkció kialakulásában.

Kísérleti állatokban az agyszövet extracelluláris környezetének *in vivo* vizsgálatára a mikrodialízis módszere széles körben elterjedt. A vizsgálni kívánt agyterületre beültetett mikrodialízis szondával a felszabaduló neurotranszmitterek koncentrációváltozása időben követhető. Időbeli felbontástól függően nagyszámú, néhány mikroliter térfogatú minták nyerhetőek. A mintákban található komponensek koncentrációja a mikromol illetve az alatti tartományban mozog, így vizsgálatukhoz megfelelő érzékenységű analitikai módszer szükséges.

A kapilláris elektroforézis egy elektromigráción alapuló elválasztástechnikai módszer. Elektromos erőter hatására az elválasztandó mintakomponensek töltésmennyiség arányuktól függően eltérő sebességgel vándorolnak a pufferoldattal töltött

kapillárisban. Az elválasztás követően a mintakomponensek detektálhatók, ez általában optikai úton történik. Kis mintaigénye, nagy hatékonysága és rövid analízisideje miatt előnyösen alkalmazható biológiai minták vizsgálatára. A kapilláris elektroforézissel elérhető nagy hatékonyság különösen alkalmas teszi a technikát optikai izomerek elválasztására. A királis elválasztás alapja a szelektor és az egyes enantiomerek között kialakuló eltérő erősségű kölcsönhatás. A szelektorral történő kölcsönhatás kromatográfiás jellegű, tehát két fázis (a puffer és a szelektor) közti megoszláson alapul, míg a vegyületek vándorlását azok elektromigrációs tulajdonságai szabják meg. Az enantiomerek sikeres elválasztása tehát két eltérő eredetű tulajdonság következtében kialakuló effektív mobilitáskülönbség következtében jön létre. Kapilláris elektroforézissel történő királis elválasztások során leggyakrabban ciklodextrineket és származékaikat alkalmazzák. Az aminosavak analízisét megnehezíti, hogy sem kromofór sem pedig fluorofór csoporttal nem rendelkeznek, így a megfelelő detektálás érdekében az elválasztást megelőzően szükséges a vegyületek származékképzése. A hagyományos UV elnyelésen alapuló detektáláshoz képest a lézer indukálta fluoreszcens detektálás több nagyságrenddel javíthatja a módszer érzékenységét.

2. Célkitűzések

A disszertáció célkitűzése az excitátoros aminosavak, ezen belül az aszpartát és a glutamát biológiai mintákból történő vizsgálatára alkalmas nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszerek kifejlesztése és validálása. Munkám során az alábbi részletes célokat tűztem ki:

1. Aszpartát és glutamát egyidejű, mikrodializátumokból történő akirális meghatározására alkalmas nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis módszer kidolgozását és validálását.
2. A Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben az aszpartát és a glutamát felszabadulási kinetikájának vizsgálatát házi csirkékben, mikrodialízis segítségével.
3. Aszpartát és glutamát enantiomerek egyidejű elválasztására alkalmas királis kapilláris elektroforézis módszer kidolgozását és validálását.
4. További együttműködésben excitátoros aminosav enantiomerek, ezen belül különös hangsúllyal a D-aszpartát koncentrációjának vizsgálatát házi csirkék különböző agyterületeiről származó szövetmintákban.

3. Módszerek

3.1 A kísérletekhez egy Beckman Coulter P/ACE-MDQ kapilláris elektroforézis készüléket használtunk. A detektálás során 488 nm hullámhosszúságú argon-ion lézerforrást alkalmaztunk, az emittált fluoreszcenciát 520 nm-en detektáltuk. Az elválasztások során 75 μm belső átmérőjű (365 μm külső átmérőjű) ömlesztett kvarc kapillárisokat használtunk. A kapillárisfal poliakrilamiddal történő borítását Hjertén és munkatársai által kidogozott protokoll szerint végeztük. A származékképzések során tipikusan 5 μl mintát vagy standard oldatot kevertünk össze 5 μl belső standardot tartalmazó származékképző pufferrel, illetve 5 μl származékképző oldattal. Ezt követően hagytuk a reakciót a megfelelő ideig, megfelelő hőmérsékleten végbemenni, majd az analízis kezdetéig a mintákat -20°C -on tároltuk. Az elválasztások 100 mM borát pufferben történtek. A fluoreszcein-izotiocianát (FITC) és a 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazolt (NBD-F) származékok elválasztása pH 8,5-es pufferben, a karboxifluoreszcein szukcinimidil észter (CFSE) származékok elválasztása pedig pH 8,0-as pufferben történt. A FITC származékok elválasztása során a háttérelektrolit 20 mM nátrium-lauriszulfátot (SDS), míg az NBD-F származékok esetén 8 mM β -ciklodextrint (β -CD) is tartalmazott. Az effektív kapilláris hossz 10 és 30 cm között, míg az alkalmazott feszültség -300 és -500 V/cm között változott. A mintainjektálás hidrodinamikai úton, 3447 Pa nyomás 5 másodpercig történő alkalmazása útján történt.

A módszerek validálását az FDA bioanalitikai módszerfejlesztési irányelvei alapján végeztük. A napon belüli és napok közötti pontosság és torzítatlanság értékek meghatározásához alacsony, közepes és magas koncentrációjú standard mintákat (0,1, 0,5 és 1 μM) használtunk. Kvantitálási határnak azt a koncentrációértéket fogadtuk el, ahol a torzítatlanság 80 és 120 % között volt és a pontosság (a mérések relatív szórása) pedig nem haladta meg a 20 %-ot, míg detektálási határnak azt a koncentrációt tekintettük, ahol a jel:zaj arány 3:1-nek adódott.

3.2 Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Anatómiai-, Szövet és Fejlődéstani Intézet munkatársai, míg a mintaanalízist kutatócsoportunk végezte. A kísérletek 1-4 napos csirkéken történtek, melyeket a Bábolna Kft.-től szereztünk be. A mikrodialízis-szondát a baloldali mediális striátumba ültettük. A mikrodialízis kísérletet a beültetéstől számított 12 órás lábadozási idő után kezdtük meg. A mikrodialízis-szondán keresztül mesterséges gerincevelő folyadékot (ACSF) perfundáltunk. A perfúzió kezdetétől számított 2-3 óra elteltével kezdtük a mintagyűjtést. Az egyes mintafrakciókat (áramlási sebességtől függően 2,5, illetve 5 μl) polipropilén mintatartó csövekbe gyűjtöttük, a gyűjtést követően a mintákat a további vizsgálatokig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fizikai stresszt a kísérletező váltotta ki az állatokból, míg a kémiai stimuláció (Ca^{2+} -megvonás, KCl, tetrodotoxin) a perfúziós folyadék cseréjével történt. A mikrodializátumok analíziséhez a FITC származékképzőre épülő akirális elválasztási módszert alkalmaztuk.

3.3 A királis elválasztások kivitelezése az akirális módszerek esetében is használt készülékekkel történt, valamint hasonlóan borított falú kapillárist alkalmaztunk. Az NBD-F-el történő származékképzés körülményei megegyeznek az akirális elválasztásoknál leírtakkal. A királis elválasztásokat 100 mM pH 8,0 borát pufferben, 5 mM 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxi)propilamino- β -ciklodextrint (HPA- β -CD) és 8 mM heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrint (DM- β -CD) szelektor jelenlétében, 50 cm effektív kapilláris hossz és 400 V/cm alkalmazott feszültség mellett végeztük. A mintainjektálást hidrodinamikus úton történt (20 s - 6,89 kPa). A módszervalidálás az FDA bioanalitikai módszerfejlesztési irányelveinek megfelelően történt, az akirális módszereknél ismertettekhez hasonlóan.

3.4 A D-aminosav analízishez használt szövetmintákat egynapos csirkékből nyertük. Az állatokat mély ketamin-xylazin anesztéziában dekapitáltuk. A megfelelő agyterületek eltávolítása sztereomikroszkóp alatt történt, majd a mintákat a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A szövetminták homogenizálása és fehérjementesítése acetonitril-víz eleggyel (2:1) történt. Centrifugálást követően a minták felülúszóját tízszeres hígítást követően vizsgáltuk.

4. Eredmények

4.1 A megfelelő érzékenység eléréséhez lézerindukált-fluoreszcencia detektálást használtunk, amely szükségessé tette az aminosavakból fluoreszcens származékok képzését az elválasztását megelőzően. Az elválasztások során borított falú kapillárist alkalmaztunk, mely az EOF elnyomásával lehetővé tette a vegyületek szelektív és gyors, anód irányú elválasztását. Az elválasztásokat lúgos pH-n (7-9) végeztük, figyelembe véve, hogy az aszpartát valamint a glutamát származékképzésüket követően, karboxil-csoportjaik révén, ilyen körülmények között két negatív töltéssel rendelkeznek. Magas töltés-tömeg arányuk miatt gyorsan vándorolnak, aminek következtében az analízisidő általánosságban nem haladta meg az 5 percet.

4.1.a A NBD-F-el történő származékképzés során vizsgáltuk a kémhatásnak és a hőmérsékletnek a reakció hatékonyságára gyakorolt hatását. A csúcsterületek 20 mM, pH 8,5 borát pufferben történő 15 perces származékképzés mellett mutattak maximumot. Száz mM pH 8,5 borát pufferben az általunk vizsgálni kívánt vegyületek elválaszthatóak voltak. A feltehetőleg a reagens feleslegből származó hidrolízistermékek zavaró hatását 8 mM β -CD alkalmazásával sikerült megszüntetni. A vizsgált vegyületek megfelelő elválasztásához 10 cm effektív kapilláris hossz is elegendőnek bizonyult, így az analízisidő alig haladta meg a 3 percet. A NBD-F származékok kalibrációja során azt tapasztaltuk, hogy az illesztett egyenes az alacsony mintakoncentrációknál jelentős eltérést mutat a mért értékekhez képest, vagyis a kalibrációs görbe 0,1 μ M alatt elhajlik. A detektálási határ aszpartát esetében 9,8 nM-nak, glutamát esetében pedig 7,8 nM-nak adódott, míg a validálási adatok alapján a kvantitálási határt mindkét aminosav esetében egységesen 0,1 μ M-nak találtuk.

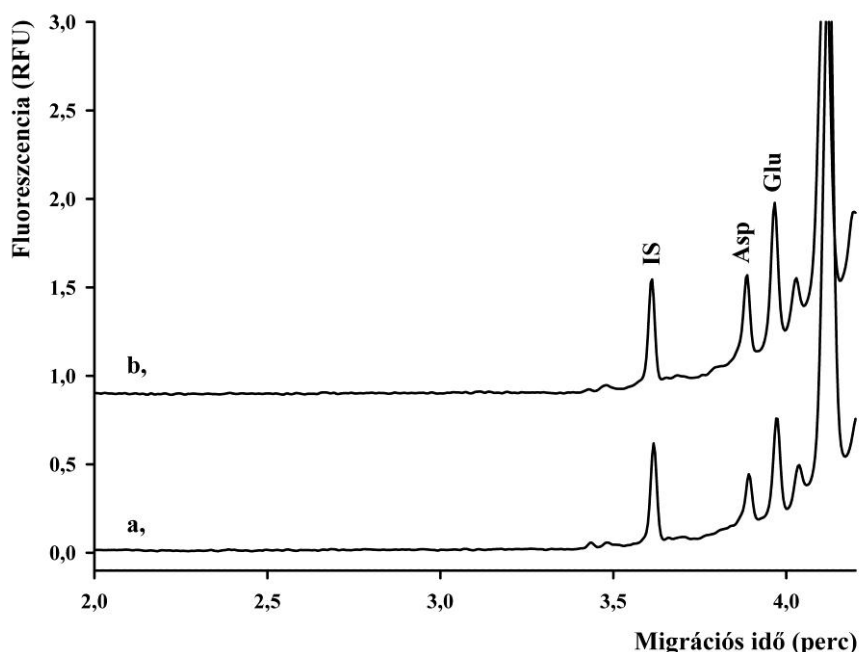
4.1.b A FITC-el történő származékképzést egy korábbi közlemény alapján minimális módosításokkal végeztük. A borát puffer kémhatása adott határokon belül (pH 8,0-9,0) nem befolyásolta jelentősen az elválasztást, ezért 100 mM pH 8,5 borát puffert alkalmaztunk. Az elválasztás további hatékonyságának

növelése 20 mM SDS alkalmazásával vált lehetővé. A megfelelő elválasztás érdekében 20 cm effektív kapillárishosszt és -300 V/cm térerőt alkalmaztunk, mely 4,5 perces analízisidőt eredményezett. A kalibráció során mindkét aminosav esetében a 0,03 μM és 1 μM közötti tartományban lineárisnak találtuk a koncentrációfüggést ($R^2_{\text{Asp}} = 0,9988$, $R^2_{\text{Glu}} = 0,9986$), ugyanakkor alacsony koncentrációértékeknél a regresszió relatív hibája magas volt ($> 20\%$). A detektálási határ 3,5 nM-nak, míg a kvantitálási határ a korábbiakhoz hasonlóan 0,1 μM -nak adódott mindkét aminosav esetében.

4.1.c A CFSE-vel történő származékképzést egy korábbi közleményben leírtaknak megfelelően, minimális módosítással végeztük. Az elválasztás során az aminosav származékok, illetve a bomlástermékek együttes vándorlása jelentős pH függést mutatott. Optimális felbontást pH 8,0 borát puffer és 40 cm effektív kapillárishossz alkalmazásával kaptunk. Minor bomlástermékekkel történő együttes vándorlás azonban ekkor is megfigyelhető volt, amit segédanyagok alkalmazásával sem lehetett megszüntetni. Az együtt vándorló csúcsok zavaró hatását a származékképzés reakcióidejének megfelelő megválasztásával (4 h) tudtuk minimálisra csökkenteni. Míg a 0,03 μM és 1 μM közötti koncentrációtartományban elvégezve a kalibrációt mindkét aminosav esetében lineáris összefüggést találtuk ($R^2_{\text{Asp}} = 0,9985$, $R^2_{\text{Glu}} = 0,9986$), az alacsony koncentrációkon ismét magas volt a regresszió relatív hibája ($> 20\%$). A detektálási határ aszpartát esetében 1,3 nM-nak, glutamát esetében pedig 1,5 nM-nak adódott, míg a kvantitálási határt ismét 0,1 μM -nak találtuk mindkét aminosav esetében

4.1.d A nagyszámú mikrodialízis minta vizsgálatára a legjobb stabilitást mutató FITC származékképző vegyületet választottuk. A módszer alkalmazhatóságának további megerősítésére a kísérleti állatok striátumából származó mikrodializátumokhoz a mért aszpartát valamint glutamát mennyiségének megfelelő mennyiségű, standardból készült mintát kevertünk. A

meghatározandó vegyületek koncentrációjában bekövetkező 50, illetve 100 %-os növekedést megfelelő, 101-108%-os torzítatlansággal tudtuk mérni (1. ábra).



1. ábra Mikrodializátum FITC-el történő származékképzést követő elválasztása.

a, egyesített mikrodializátum; b, 50%-os csúcsaddíciójú minta

Elválasztási körülmények: 20/30 cm x 75 μ m lineáris poliakrilammiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 3,447 kPa 5s; 100 mM borát puffer, pH 8,5, 20 mM SDS; 300 V/cm, 25 °C

4.2 Az excitátoros aminosavak koncentrációváltozását a mikrodializátumokban a kísérleti állatok kezelését megelőzően nyert mintákban mérhető koncentrációk (nyugalmi koncentrációk) átlagára (alapkonzentráció, 100%) vonatkoztatva fejeztük ki. A kísérletek során 1 μ l/perc átfolyási sebességet alkalmazva 5 μ l térfogatú frakciók gyűjtésével 5 perces időbeli felbontást értünk el.

4.2.a A kísérletek során az állatokat 15 percen keresztül manuálisan stresszeltük („mild-chasing”). Stressz hatására mindkét aminosav koncentrációja szignifikánsan megnőtt és a stressz-hatás alatt végéig emelkedett maradt az alapkonzentrációhoz képest. A Na⁺-csatorna gátló, ezáltal a szinaptikus ürülést blokkoló hatású TTX együttes adása során a stresszhatás semmilyen szignifikáns változást nem okozott az aminosavak koncentrációjában, míg a TTX önmagában nem befolyásolta jelentősen az alapkonzentrációkat. Ca²⁺-

mentes, EGTA-t tartalmazó ACSF alkalmazása mellett a stressz okozta látszólagos glutamát koncentrációemelkedést nem találtuk szignifikánsnak.

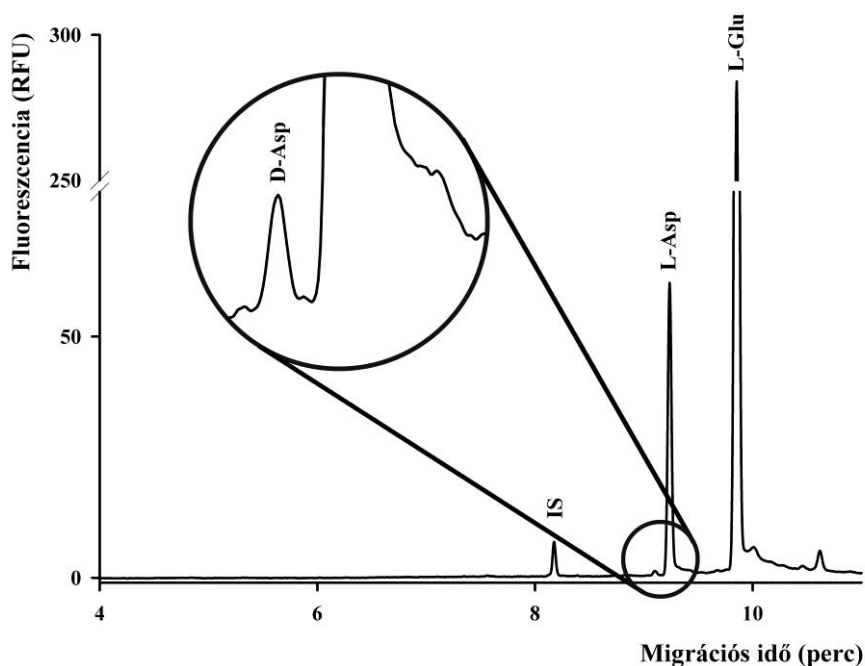
4.2.b A stresszhez hasonlóan 50 mM KCl is jelentős transzmitterfelszabadulást váltott ki. Különösen nagy emelkedést tapasztaltunk abban az esetben, amikor a KCl kezelést fizikai stresszelés előzte meg. Ezt a jelenséget a viselkedés kiváltotta szinaptikus potenciációval magyarázhatjuk. Az emelkedést azonban a kezelés fennállása ellenére is gyors csökkenés követte, ami feltehetőleg a transzmitter raktárak kiürülésének következménye. A felszabadulás a korábbiakhoz hasonlóan gátolható volt mind tetrodotoxinnal mind Ca^{2+} -megvonással.

Az egyes stimulációk során az ürülő aszpartát és glutamát 50-60 %-a aszpartát volt, míg stimuláció hiányában az aszpartát/glutamát arány széles tartományban, 10-60% között változott. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az aszpartát részben glutamáttól független mechanizmus révén szabadul fel.

4.3 Az aszpartát valamint a glutamát enantiomerek alapvonali elválasztása 100 mM pH 8,0 borát pufferben 3 mM HPA- β -CD alkalmazása mellett lehetővé vált. Nagy L-enantiomer felesleget feltételezve azonban szükségesnek láttuk a rendszer szelektivitásának további növelését. Bár a DM- β -CD-nel csak részleges királis elválasztást értünk el, megfigyeltük, hogy a kölcsönhatás jelentősen erősebb a glutamát enantiomerekkel mint az aszpartát enantiomerekkel. A kémiai szelektivitás növelésére így a DM- β -CD megfelelőnek tűnt. A továbbiakban HPA- β -CD-t és DM- β -CD-t tartalmazó kettős ciklodextrin rendszereket vizsgáltunk. Míg a szelektorok alacsony koncentrációja esetében nem kaptunk megfelelő elválasztást, magas koncentrációi jelentősen megnövelték az analízisidőt. Kompromisszumként mindkét szelektor esetén egy köztes koncentrációt választottunk: 5 mM HPA- β -CD, valamint 8 mM DM- β -CD keveréke megfelelő felbontás mellett biztosította a vizsgálni kívánt vegyületek hatékony és szelektív elválasztását, míg a teljes analízisidő kevesebb volt, mint 10 perc. Előzetes vizsgálatok alapján a szövetmintákban az L-, illetve

D-aszpartát arányát hozzávetőleg ötvenszeresnek találtuk. Ennek megfelelően a teljes validációs folyamat alatt mindkét aminosav esetén ötvenszeres koncentrációkülönbséget alkalmaztunk az L-enantiomer javára. A módszer kvantitatív mérési határát a D-aminosavakra 0,05 μM -nak találtuk.

4.4 A királis módszer alkalmazhatóságát naposcsirkéből származó agyszövet minták vizsgálatával bizonyítottuk (2. ábra). A mérések során három agyterületet vizsgáltunk: a szubventrikuláris zónát (SVZ), a nidopalliumot és a cerebellumot. A minták D-aszpartát koncentrációja 0,15-0,45 μM között változott (15-45 nmol/mg szövet), ami a teljes aszpartát mennyiség 1-2%-át tette ki. A mintákban D-glutamátot nem tudtunk kimutatni.



2. ábra Csirke agyszövetéből készült mintában történő excitátoros aminosavszármazékok elválasztása. Elválasztási körülmények: 50/60 cm x 75 μm lineáris poliakrilamiddal borított falú ömlesztett kvarc kapilláris; injektálás: 6,89 kPa 20s; 100 mM borát puffer pH 8,0 + 8 mM DM- β -CD + 5 mM HPA- β -CD; 400 V/cm, 25 ° C

5. Következtetések

5.1 Három eltérő fluoreszcens származékképzőre épülő, mikrodialízátumokban jelenlévő alacsony koncentrációjú excitátoros aminosavak érzékeny meghatározása alkalmas kapilláris elektroforézis módszert dolgoztunk ki. Az elválasztásokat lúgos pH-n, borított falú kapillárisban végeztük, így az analízisidő egyik származékképző esetében sem haladta meg az 5 percet. A módszerek validálása során az egyes származékképzőkkel elérhető detektálási érzékenység között jelentős különbséget találtunk, ugyanakkor mindegyik módszer csak egy, a detektálási határhoz képest viszonylag magas koncentrációértékig ($0,1 \mu\text{M}$) nyújtott megfelelő kvantitatív pontosságot. A jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a származékképzési reakció alacsony koncentrációtartományban már nem kvantitatív, így bár a vizsgálandó vegyületek nanomólos koncentrációtartományban még detektálhatóak, megfelelő pontossággal történő meghatározásuk már nem kivitelezhető. Demonstráltuk, hogy a módszer pontosságának és torzítatlanságának bizonyítására kizárólag a megfelelő validáció alkalmas. Ezzel szemben a becsült, vagy a kalibráció linearitása alapján meghatározott analitikai paraméterekkel rendelkező módszerek pontossága, különösen alacsony mintakoncentráció esetében megkérdőjelezhető. A kidolgozott módszerek alkalmasnak bizonyultak mikrodialízátumok vizsgálatára.

5.2 A Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben vizsgáltuk házi csirkék striátumából származó agyi mikrodialízátumok excitátoros aminosav tartalmát, valamint ezen transzmitterek koncentrációváltozását eltérő stimulusok hatására. Kísérleteinkben az aszpartát és a glutamát ürülése mind fizikai stresszeléssel, mind kémiai stimulációval (KCl) kiváltható volt. Tetrodotoxin alkalmazása, illetve a lokális Ca^{2+} -megvonás a transzmitterek felszabadulását gátolta, ami alátámasztja a stimuláció hatására ürült transzmitterek szinaptikus eredetét. Az alapkonzentráció értékeket ugyanakkor mindkét kezelés csak minimális mértékben befolyásolta, melyből

következik, hogy az aminosavak nyugalmi alapkoncentrációjának fenntartásáért döntően nem szinaptikus folyamatok felelősek. Az aszpartát glutamáttól részben független felszabadulása az eltérő biológiai funkció lehetőségét veti fel. A kidolgozott állatmodellen számos összetett viselkedés neurokémiai háttere, illetve farmakonok neurotranszmisszióra gyakorolt hatása is vizsgálható a továbbiakban.

5.3 Az akirális módszerekhez hasonlóan az aszpartát és glutamát enantiomerek elválasztása során is fluoreszcens származékképzést, és az azt követő lézerindukált-fluoreszcencia detektálást alkalmaztunk. Az elválasztást azonban nemcsak a D-enantiomerek alacsony koncentrációja, hanem az egyidejűleg jelen lévő nagy L-enantiomerfelesleg is megnehezítette. A rendszer szelektivitásának beállítására kettős ciklodextrin rendszert fejlesztettünk ki, az 5 mM HPA- β -CD mellett 8 mM DM- β -CD-t alkalmazva lehetőség nyílt valamennyi vizsgált vegyület enantiomereinek egyidejű elválasztására. A hasonló szakirodalomban közölt módszerekkel szemben elsőként, a módszervalidálás során figyelembe vettük és alkalmaztuk a vizsgálandó szövetmintákra jellemző koncentrációarányokat (L - D enantiomer-arány: 1:50). A D-aminosavakra kapott detektálási valamint kvantitálási határ a legalacsonyabb a validált kapilláris elektroforézis módszerek között. Az akirális módszerekhez képest alacsonyabb kvantitálási határt az egyidejűleg jelen lévő nagy L-enantiomer felesleg magyarázhatja, amely növelheti a származékképzés hatékonyságát.

5.4 Az egyes agyterületek D-aszpartát tartalma állatonként nagy szórást mutatott, ugyanakkor állatonként az SVZ D-aszpartát tartalmát magasabbnak találtuk, mint a többi régiókét (nidopallium, cerebellum). Az SVZ-ben ebben az életkorban még aktív sejtosztódás figyelhető meg, míg a nidopallium, valamint a cerebellum már nem tartalmaz neuronális összejteket. A mintaszám azonban nem volt elegendő a szignifikáns különbség megállapításához.

6. Összefoglalás

A glutamát és az aszpartát a központi idegrendszer két legjelentősebb excitátoros neurotranszmittere. Míg a glutamát szerepét széleskörűen vizsgálják, az aszpartát funkciójának tisztázása számos folyamatban, mint pl. tanulás, vagy a memória kialakulása további vizsgálatokat igényel. Az elmúlt évtizedekben számos aminosav D-formáját, többek között a D-aszpartátot is kimutatták madarak, illetve emlősök agyszövetében. A kis számú rendelkezésre álló kísérleti adat alapján a D-aszpartátnak az idegrendszer korai fejlődésben lehet szerepe.

Munkám során olyan akirális és királis kapilláris elektroforézis módszereket dolgoztam ki, amelyek alkalmasak az excitátoros aminosavak, valamint enantiomerjeik biológiai mintákból történő meghatározására. A megfelelő érzékenység elérése érdekében lézerindukálta fluoreszcencia detektálást alkalmaztunk, mely azonban megköveteli a minták analízist megelőző származékképzését. Három, különböző származékképző reagensen alapuló akirális elválasztási módszert, továbbá egy 7-fluoro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazollal (NBD-F) történő származékképzést követő királis módszert. Az akirális módszerek közül a fluoreszcein izotiocianát (FITC) származékok elválasztására épülő módszert alkalmaztuk az agyi mikrodializátumok vizsgálatára. A Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetével együttműködésben mikrodialízis kísérletek során vizsgáltuk házi csirkék striátumában az aszpartát és a glutamát felszabadulást különböző stimulusok hatására.

A királis elválasztási módszerrel házi csirkék agyszövetének D-aszpartát tartalmát, valamint annak arányát vizsgáltuk a teljes aszpartát mennyiséghez képest. A módszervalidálás során a detektálási és a kvantitálási határok között jelentős különbséget találtunk, amely feltehetőleg az alacsony koncentrációk esetében már nem kvantitatív származékképzési reakció következménye. A mikrodialízis kísérletekben bebizonyítottuk, hogy az aszpartát a glutamáttal együtt szinaptikus úton ürül. Az eltérő agyterületekből származó agyszövetminták D-aszpartát tartalmának meghatározása során bizonyítottuk, hogy az általunk kidolgozott módszer alkalmas biológiai minták vizsgálatára.

7. Saját publikációk jegyzéke

7.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

Wagner Zs, Tábi T, Zachar G, Csillag A, Szökő É. (2011) Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE-LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. *Electrophoresis*, 32: 2816–2822. **IF: 3,303**

Zachar G, **Wagner Zs**, Tábi T, Bálint E, Szökő É, Csillag A. (2012) Differential Changes of Extracellular Aspartate and Glutamate in the Striatum of Domestic Chicken Evoked by High Potassium or Distress: An In Vivo Microdialysis Study. *Neurochem Res* 37: 1730-1737. **IF: 2,24**

Wagner Zs, Tábi T, Jakó T, Zachar G, Csillag A, Szökő É. (2012) Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system. *Anal Bioanal Chem*, 404: 2363-2368. **IF: 3,778**

7.2 Az értekezés témájától független közlemények

Balogh B, Jójárt B, **Wagner Zs**, Kovács P, Máté G, Gyires K, Zádori Z, Falkay G, Márki Á, Viskolcz B, Mátyus P. (2007) 3D QSAR models for α_2A -adrenoceptor agonists. *Neurochem Int*, 51: 268-276. **IF: 2,975**

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szökő Éva** Professzor Asszonynak, aki kezdetektől fogva támogatott, és tanácsaival folyamatosan irányította kutatói munkámat. Köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György** Professzor Úrnak a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, hogy az intézetben végzett munkámat lehetővé tette. Köszönettel tartozom **Dr. Tábi Tamás** kollegámnak, a kapilláris elektroforézis kísérletekben nyújtott segítségével, valamint számos értékes gyakorlati tanácsáért és javaslatáért. Köszönettel tartozom továbbá a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak, **Dr. Zachar Gergelynek** és **Dr. Csillag András** Professzor Úrnak a mikrodialízis kísérletekért, valamint a közös munkánkba vetett töretlen bizalmukért. Köszönettel tartozom a **Gyógyszerhatástani Intézet** valamint a **NET Központi Izotóp Labor** munkatársainak szakmai és baráti segítségükkel járultak hozzá, hogy munkámat színvonalas szakmai környezetben végezhessem. Köszönettel tartozom az **Aesculap Alapítványnak** valamint a **Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványnak** anyagi támogatásukért. Köszönettel tartozom **családomnak**, akik odaadóan támogatták elképzeléseim megvalósítását, biztos háttérrel nyújtottak tudományos munkámhoz, és ezen dolgozat létrejöttéhez.